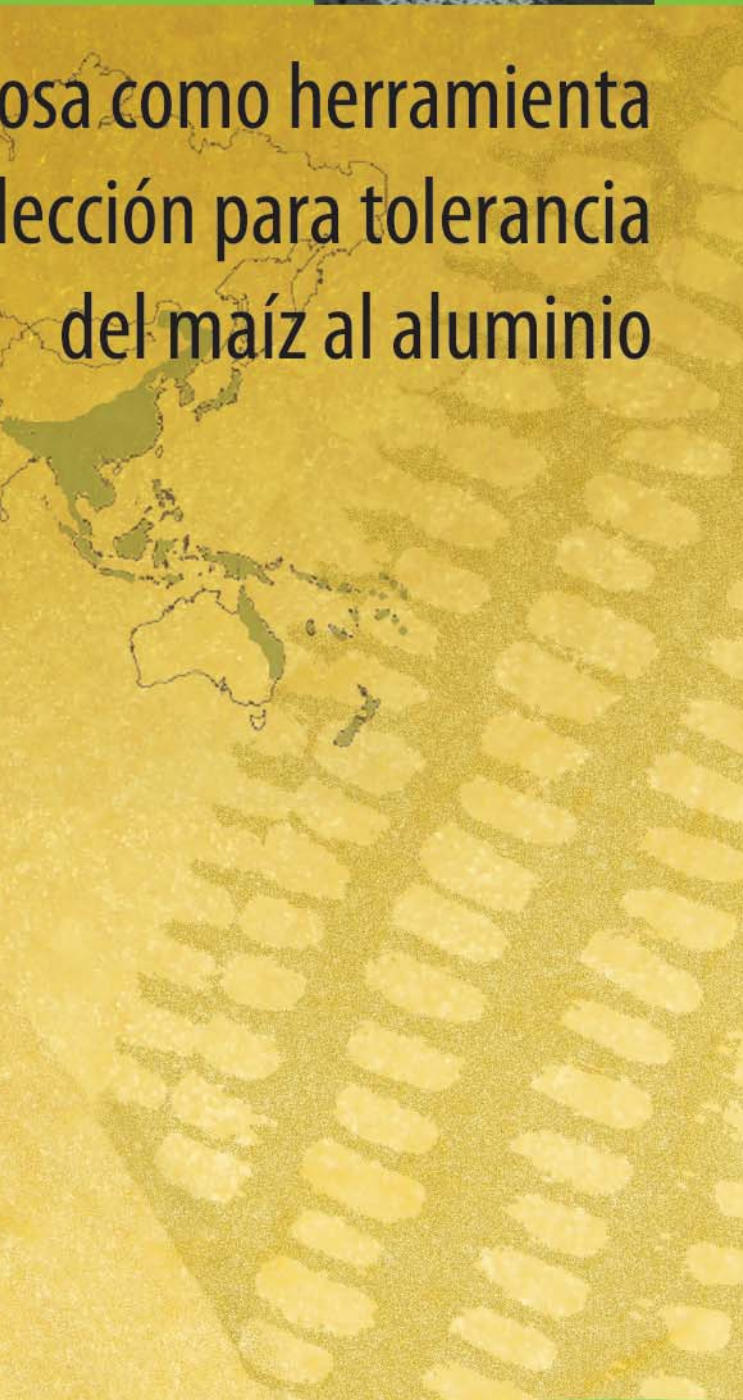


Manual de laboratorio



Calosa como herramienta
de selección para tolerancia
del maíz al aluminio



Manual de laboratorio

Calosa como herramienta de selección para tolerancia del maíz al aluminio

Alba Lucía Arcos¹ y Luis A. Narro

La impresión de este manual es parte de una de las actividades del proyecto 2007X 7143-921 "Generación y selección de germoplasma de maíz de alto potencial de rendimiento y de buena adaptación para las condiciones del sistema maíz-soya en la Altillanura Colombiana encaminado a mejorar la productividad y competitividad de las cadenas avícola y porcícola". Este proyecto es ejecutado por CIMMYT-CORPOICA-FENALCE con financiamiento del Ministerio de Agricultura de Colombia.

¹ Dirija su correspondencia a Dra. Alba Lucía Arcos, AA6713 CIAT/CIMMYT, Cali, Colombia.

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, conocido como el CIMMYT® (www.cimmyt.org), es un organismo internacional, sin fines de lucro, que se dedica a la investigación científica y la capacitación. Junto con nuestros colaboradores en más de 100 países, aplicamos la ciencia con el objeto de incrementar la seguridad alimentaria, mejorar la productividad y la rentabilidad de los sistemas de producción de maíz y de trigo, y conservar los recursos naturales del mundo en desarrollo. Nuestros productos y servicios incluyen variedades mejoradas de maíz y trigo, avanzados sistemas de cultivo, la conservación de los recursos genéticos del maíz y del trigo, y la formación de capacidad humana. El CIMMYT forma parte del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) (www.cgiar.org) y recibe fondos de su parte, así como de gobiernos nacionales, fundaciones, bancos de desarrollo y otras instituciones públicas y privadas.

© Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) 2009. Derechos reservados. El CIMMYT es el único responsable de esta publicación. Las designaciones empleadas en la presentación de los materiales incluidos en esta publicación de ninguna manera expresan la opinión del CIMMYT o de sus patrocinadores respecto al estado legal de cualquier país, territorio, ciudad o zona, o de las autoridades de éstos, o respecto a la delimitación de sus fronteras. El CIMMYT autoriza el uso de este material, siempre y cuando se cite la fuente.

Cita correcta: Arcos, A.L.; Narro, L.A. Calosa como herramienta de selección para tolerancia del maíz al aluminio. Manual de laboratorio. 2009. México, D.F.: CIMMYT.

Descriptores AGROVOC: *Zea mays*; calosa; herencia; dialelo; heterosis; métodos de selección; suelos ácidos; germoplasma; Colombia.

Códigos de categoría AGRIS: F30 Fitogenética y Fitotecnia

Clasificación decimal Dewey: 631.5

ISBN: 978-970-648-172-6

Impreso en México

Índice

Prólogo.....	vi
1. Producción	1
2. Suelos ácidos	1
3. Métodos de evaluación para resistencia a suelos ácidos	3
3.1 Evaluación en campo	3
3.2 Evaluación en macetas.....	3
3.3 Evaluación en una solución nutritiva.....	3
3.4 Evaluación en laboratorio: determinación de calosa (1,3 β-D-glucano).....	3
4. Calosa	4
4.1 Funciones.....	5
4.2 Metabolismo de la calosa	5
5. Determinación de calosa en ápices radiculares.....	6
5.1 Fase de invernadero.....	6
5.1.1 Preparación de semilla.....	6
5.1.2 Preparación de la solución nutritiva.....	7
5.1.3 Trasplante	7
5.1.4 Tratamiento con aluminio	8
5.2 Determinación de calosa	8
5.2.1 Preparación de reactivos.....	8
5.2.2 Preparación de muestras (ápices radiculares).....	8
5.2.3 Medición en el espectrofotómetro.....	9
5.3 Procesamiento de datos	9
6. Bibliografía.....	11
Anexo 1. Preparación de solución nutritiva (invernadero).....	12
Anexo 2. Preparación de reactivos (laboratorio)	13
Anexo 3. Preparación de estándares	15
Anexo 4. Manejo del programa del espectrofotómetro.....	16

Tablas

Tabla 1. Distribución de suelos ácidos en Sudamérica	2
Tabla 2. Características de los suelos de una sabana nativa de los Llanos Orientales de Colombia	2
Tabla 3. Concentración de Pachyman e intensidad de fluorescencia para la curva de calibración	9
Tabla 4. Contenido de calosa en líneas de maíz con aluminio (25 μM Al) y sin aluminio (0 μM Al)	10
Tabla A1. Componentes de la solución nutritiva.....	12
Tabla A2. Concentraciones para la preparación de la solución estándar.....	15

Figuras

Figura 1. Mapa de la distribución de suelos ácidos en el mundo	2
Figura 2. Estructura de la calosa (polímeros de glucosa).....	4
Figura 3. Lugar de la raíz donde se produce daño por aluminio	4
Figura 4. Representación de la posible ruta de formación de calosa en la célula.....	5
Figura 5. Posición de las semillas en papel para su germinación	6
Figura 6. Aseguramiento de las semillas con bandas de caucho	6
Figura 7. Posición de los rollos de papel con semilla, previamente rotulados, que se guardarán en cámaras de germinación.....	7
Figura 8. Enrollamiento de las plántulas de maíz en espuma para luego ser sumergidas en una solución nutritiva.....	7
Figura 9. Aireación continua de la solución nutritiva en las bandejas con plántulas de maíz.....	7
Figura 10. Corte y almacenamiento de un centímetro de ápice radicular después de haber sido expuesto a un tratamiento con aluminio por 12 horas.....	8
Figura 11. Concentración de Pachyman e intensidad de fluorescencia en ápices radiculares de maíz	9
Figura 12. Intensidad de fluorescencia y contenido de calosa ($\mu\text{gPE}/1$ cm ápice radicular) en líneas de maíz	10
Figura 13. Contenido de calosa ($\mu\text{gPE}/1$ cm ápice radicular) en líneas de maíz con y sin tratamiento de aluminio.....	10
Figura 14. Diferencias notables en la formación de calosa en líneas endogámicas de maíz y testigos (ATP y Lixis)	10

Prólogo

Nuestro propósito al publicar este manual es compartir información útil con agricultores, técnicos y extensionistas que trabajan en suelos donde el exceso de aluminio es un factor limitante para la producción de maíz, un cereal básico en la alimentación de millones de personas.

La calosa es un marcador fisiológico que discrimina genotipos de maíz tolerantes y sensibles al aluminio, el cual se mide en los ápices radiculares durante los primeros estadios de la planta, dos días después de que concluye el proceso de germinación. Por tanto, se puede utilizar como herramienta para acelerar los procesos de selección y aumentar la eficiencia en la obtención de materiales genéticos útiles.

Los procedimientos aquí descritos se desarrollaron en la Universidad de Hannover, Alemania, en colaboración con el CIMMYT, y fueron validados en el Programa de Maíz del CIMMYT-Colombia.

Los autores reiteran su agradecimiento a los Drs. Dejene Eticha y Walter Horst, de la Universidad de Hannover, por ayudarnos a estandarizar el protocolo para la determinación de calosa en el CIMMYT-Colombia; al Dr. Idupulapati Rao y su equipo de trabajo, del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), por permitirnos usar el invernadero y el laboratorio de fitonutrición para validar la técnica; a la Dra. Sol Medina, del INIA-Venezuela, por su colaboración en la estandarización de la técnica y en la preparación del primer manuscrito de este manual; y al Dr. Kevin Pixley, Director Asociado del Programa Global de Maíz del CIMMYT, por revisar los manuscritos del manual y por su continuo apoyo en todas las fases de la obra hasta su publicación.

Si tiene algún comentario o sugerencia, o ambos, que nos ayuden a mejorar este manual, mándelo a la atención de los autores: Alba Lucía Arcos (alarcos@cgiar.org) o Luis A. Narro (lnarro@cgiar.org).

1. Introducción

De acuerdo con proyecciones para el año 2020, la demanda de maíz en los países en desarrollo superará la demanda de trigo y de arroz. Si se considera que en 1995 se consumieron 558 millones de toneladas de maíz, la demanda de 837 millones de toneladas para 2020, significa un incremento del 50%. En el mismo periodo, la demanda de maíz crecerá en África subsahariana de 27 a 52 millones de toneladas; en Latinoamérica de 76 a 123 millones de toneladas; y en el este y sureste de Asia de 150 a 280 millones de toneladas (Pingali, 2001).

El área con suelos ácidos en el mundo ofrece una alternativa para la producción de alimentos, siempre y cuando se disponga de tecnología adecuada y sea la producción sostenible y rentable. Las actividades del CIMMYT para seleccionar genotipos de maíz tolerantes a suelos ácidos han favorecido el incremento de los rendimientos de este cereal, de 0.5 t/ha de cultivares o variedades nativas a cerca de 10 t/ha en híbridos experimentales (Narro, datos sin publicar). Esto significa que los rendimientos de maíz en suelos ácidos pueden superar los rendimientos promedio actuales de 1.5 t/ha en las áreas tropicales de África subsahariana; de 2.8 t/ha en Latinoamérica; y de 3.6 t/ha en Asia (Gollin, 2006).

Sin embargo, uno de los factores limitantes de capital importancia en muchas de las zonas de suelos ácidos es la toxicidad causada por aluminio (Al) (Foy, 1988). La mejora genética de maíz para suelos con estos componentes incluye la selección de genotipos tolerantes. Se han desarrollado técnicas mediante las cuales es posible identificar genotipos sensibles al aluminio en el laboratorio; una de ellas —tema de este manual— es la determinación del polisacárido calosa, que se forma en la raíz de la planta y ofrece una alternativa de selección de genotipos tolerantes a suelos con alto contenido de aluminio, principal problema en los suelos ácidos. La aplicación de este método de selección podría ayudar a incrementar la productividad de maíz,

un cereal básico en la alimentación de gran parte de la población mundial, además de su extensivo uso industrial.

Este manual, que está dirigido a entidades interesadas en el mejoramiento de maíz en ambientes donde predomina la acidez del suelo, consta de seis secciones, contando la bibliografía, y cuatro anexos. Después de las secciones introductorias, en la tercera sección se describe la técnica para evaluar la resistencia de los genotipos a los suelos ácidos, en campo y en laboratorio; la cuarta contiene una descripción de la calosa, sus funciones y metabolismo; en la sección cinco se indica cómo determinar la cantidad de calosa en los ápices radiculares. En los anexos 1-3 se describen, paso a paso, los protocolos para preparar soluciones, reactivos y estándares. Por último, una guía para el manejo del espectrofotómetro.

2. Suelos ácidos

Los suelos ácidos en el mundo abarcan una superficie de 3 mil 950 millones de hectáreas (von Uexkull y Mutert, 1995). De esta cifra, 24.8% se encuentra en África; 33.3% en Sudamérica y 19.4% en Asia (Eswaran et al. 1997). En las zonas templadas, los suelos ácidos son predominantemente orgánicos (espodosoles, alfisoles, inceptisoles y histosoles), mientras que en las zonas tropicales, los suelos son ácidos minerales, entre los que predominan los ultisoles y los oxisoles (von Uexkull y Mutert, 1995). En las zonas tropicales de América, África y Asia, los oxisoles ocupan 81%, 56% y 38%, respectivamente (Eswaran et al. 1997) (Figura 1).

Los suelos ácidos minerales pueden ser resultado de materiales con bajo contenido de cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+) o de una disminución de pH ocasionada por la lixiviación de estos elementos. Otra causa de la acidificación de los suelos suelen ser las prácticas agrícolas que incluyen la aplicación de urea, sulfato de amonio y fosfato diamónico. Las fuentes orgánicas de nitrógeno también pueden ser causa de acidificación; por ejemplo, el estiércol orgánico y la orina contienen compuestos nitrogenados que al ser mineralizados y oxidados producen H^+ y, por

consiguiente, acidez. Asimismo, existen plantas con la capacidad de absorber el exceso de cationes (K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}), comparada con la absorción de aniones (NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} y PO_4^{3-}), y de mantener la neutralidad eléctrica gracias a que liberan iones H^+ en la solución suelo (Bolan et al. 1991). Del mismo modo, la lluvia ácida, que contiene ácido sulfúrico y ácido nítrico, está ocasionando un incremento en las áreas con suelos ácidos en muchos lugares del mundo (Samac y Tesfaye, 2003). A medida que el pH disminuye, el aluminio se solubiliza, y cuando el pH llega a < 5.5 produce toxicidad en las plantas.

Los suelos ácidos constituyen una de las pocas áreas de expansión de la frontera agrícola en el mundo. Por ejemplo, en Sudamérica la superficie de oxisoles y ultisoles es de 808 millones de hectáreas; los países donde éstos predominan son Brasil (70.8%); Colombia (8.3%); Perú (6.9%); Venezuela (6.4%) y Bolivia (4.9%) (Cochrane, 1979). El área que se cultiva actualmente en cada país, en el mismo orden en que se menciona, corresponde a 66.5, 4.3, 4.2, 3.4 y 3.1 millones de hectáreas, lo cual indica que, si quisiera duplicarse el área cultivable en cada uno de ellos, tendría que utilizarse, respectivamente, 11.6%, 6.4%, 7.5%, 6.5% y 7.8% del área con suelos ácidos (Tabla 1). En la Tabla 2 se describen las características de los suelos ácidos de una sabana nativa en los Llanos Orientales de Colombia.

Tabla 1. Distribución de suelos ácidos en Sudamérica.

País	Suelos ácidos		Área	
	(millones ha)	%	sembrada actual (millones ha)	% ⁽¹⁾
TOTAL	808	100		
Brasil	573	70.9	66.5	11.6
Bolivia	40	4.9	3.1	7.8
Colombia	67	8.3	4.3	6.4
Perú	56	6.9	4.2	7.5
Venezuela	52	6.4	3.4	6.5
Otros	2	2.5		

⁽¹⁾ Porcentaje del área con suelos ácidos necesaria para duplicar la superficie agrícola actual en cada país.

Tabla 2. Características de los suelos de una sabana nativa de los Llanos Orientales de Colombia.

Variable	Cifra
pH	3.8
Materia orgánica (%)	2.7
Saturación de Aluminio (%)	94
P (ppm)	1.65
Ca (meq/100g s)	0.8
Mn (meq/100g s)	0.81
Fe (meq/100g s)	14.19
Zn (meq/100g s)	0.29

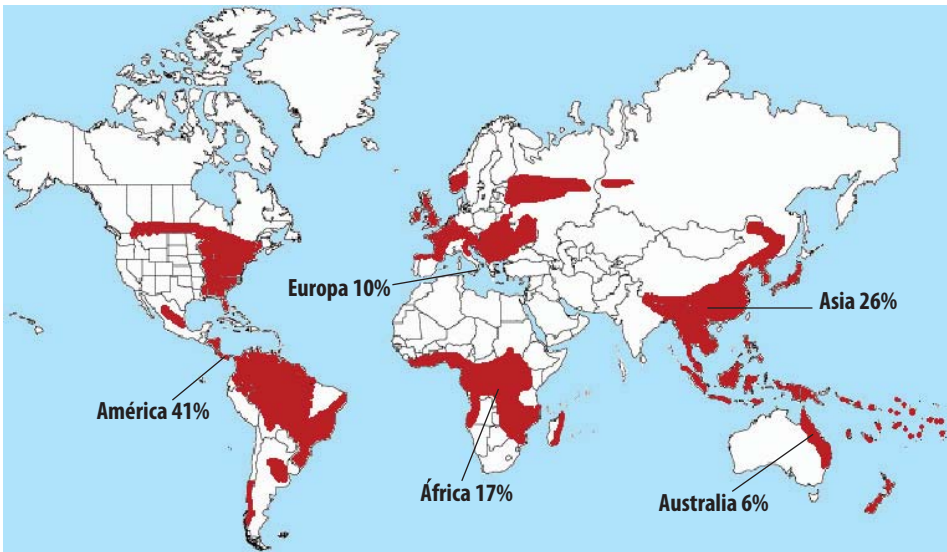


Figura 1. Mapa de la distribución de suelos ácidos en el mundo.

3. Métodos de evaluación para resistencia a suelos ácidos

Para desarrollar germoplasma tolerante a suelos ácidos, es necesario disponer de métodos eficientes de selección, a fin de que las variedades que vayan a generarse tengan un buen comportamiento en ambientes con suelos de estas características, pero sobre todo en suelos sin problemas de acidez. Obviamente, esto dependerá de la estrategia de evaluación y selección de variedades que se ponga a disposición de los productores. Los métodos de selección que para este fin se utilizan incluyen evaluaciones en campo y ensayos tanto en invernadero como en laboratorio.

3.1 Evaluación en campo

La evaluación de genotipos en el campo es un proceso indispensable, pese a que es costoso y a menudo afectado por considerables errores experimentales, como consecuencia de la variabilidad espacial típica de los suelos ácidos. Como criterio para evaluar la toxicidad del aluminio en el campo se ha utilizado el porcentaje de saturación, que es la relación entre el contenido de este elemento en el suelo y la capacidad de intercambio catiónico efectivo que se produce entre el aluminio, el calcio, el potasio, el magnesio y el sodio (Bahia Filho et al. 1997). Básicamente, en el campo se establecen ensayos de evaluación de cultivares (líneas, híbridos o variedades de polinización libre) y se seleccionan los mejores, tomando como base el rendimiento de grano y otras características agronómicas de interés (resistencia a enfermedades, aspecto de la mazorca, etcétera). Es conveniente evaluar simultáneamente materiales en suelos fértiles (sin problema de acidez) para poder seleccionar los mejores cultivares usando una estrategia que integre los resultados que se obtienen en ambas condiciones de campo.

3.2 Evaluación en macetas

En virtud de que esta técnica requiere grandes niveles de estrés edáfico, es recomendable utilizar muestras de subsuelo en lugar de suelo de la capa

superior. Los mejores resultados de evaluación en macetas se han obtenido cuando las plantas se mantienen por 14 días en suelos con saturaciones de aluminio de entre 45 y 65%. En un trabajo de Urrea-Gómez et al. (1996), se llegó a la conclusión de que el método es útil para diferenciar los genotipos resistentes de los genotipos susceptibles, pero no para diferenciar los niveles de tolerancia.

3.3 Evaluación en una solución nutritiva

Un punto crítico en el uso de soluciones nutritivas es la relación fósforo:aluminio (P:Al), ya que el nivel de P no debe interferir con el nivel de estrés causado por aluminio en el proceso de selección. La relación deseable de P:Al es 1:5 (Bahia Filho et al. 1997). Como criterio para seleccionar individuos tolerantes se emplea la longitud relativa de la raíz seminal (LRRS), que se obtiene dividiendo la longitud final de la raíz seminal por la longitud inicial de la misma antes de la aplicación de aluminio (Furlani y Clark, 1981; Magnavaca et al. 1987). Los valores más elevados de LRRS corresponden a los genotipos más tolerantes.

También se ha evaluado el uso de soluciones nutritivas agregando colorantes, como hematoxilina, por ejemplo. En un trabajo de Giaveno y Miranda Filho (2000), las plántulas fueron sometidas a un tratamiento con aluminio por 24 horas y luego se colorearon con hematoxilina por 20 minutos. Las plantas sensibles adquirieron una intensa coloración azul en los ápices radiculares. Este criterio es útil en la selección de genotipos de maíz resistentes o sensibles al aluminio (Cancado et al. 1999).

3.4 Evaluación en laboratorio: determinación de calosa (1,3 β -D-glucano)

Se utiliza para medir la sensibilidad de las plantas al aluminio. Dado que en el maíz que se expone a la presencia de este elemento la calosa se forma en el ápice radicular (Wissemeier et al. 1987), esta técnica se convierte en una herramienta útil para seleccionar genotipos resistentes (Horst et al. 1997; Eticha et al. 2005; Collet et al. 2002). Mediante el proceso que aquí se describe es posible hacer una

evaluación rápida, porque la exposición de una plántula de maíz por un periodo de 12 horas a una solución 25 μ M de aluminio será suficiente para medir su resistencia o sensibilidad.

Para la evaluación del material se corta un centímetro de ápice radicular, ya que la calosa se produce en el segundo milímetro de esta parte de la raíz (Sigavuru y Horst, 1998) (Figura 3). Los genotipos con mayor cantidad de calosa se clasifican como sensibles al aluminio. Sin embargo, aunque a priori la técnica parece ser muy eficiente, deberá tenerse en cuenta la respuesta de los genotipos en el campo. En estudios realizados por Eticha et al. 2005, en que se evaluaron 11 variedades de maíz de polinización libre (padres) y sus 55 cruzamientos, se observó que en la evaluación de estos últimos la correlación fenotípica fue de $r = -0.45^{**}$ entre el contenido de calosa y el rendimiento de grano en suelos ácidos; en tanto que en la evaluación de padres, la correlación resultó no significativa ($r = -0.56$). En estudios realizados por el CIMMYT en Colombia se determinó que la correlación genotípica entre el contenido de calosa y el rendimiento de grano en suelos ácidos, resultado de la evaluación de 40 líneas endogámicas de maíz, fue de $rg = -0.73^{**}$.

La determinación de calosa en ápices radiculares de maíz como herramienta para seleccionar genotipos resistentes al aluminio es el principal objetivo de este manual y por tanto se tratará con más detalle en la sección 4.

4. Calosa

La calosa es un polisacárido lineal conocido como 1,3- β -D-glucano (Figura 2), que difiere de la celulosa (1,4- β -D-glucano) en una ramificación. Con frecuencia se encuentra en la pared celular y es insoluble en agua pero parcialmente soluble en álcalis. Representa uno de los pocos polisacáridos de la pared celular capaz de ser localizado citoquímicamente, formando

complejos con colorantes (anilinas) (Kauss, 1985). También se ha reportado la presencia de calosa en las paredes celulares de algunas levaduras, hongos y bacterias (Stone y Clark, 1992; Kauss, 1996). Un incremento intracelular de calcio altera la estructura y función de los plasmodesmos, limita el paso de agua y de nutrientes entre las células y estimula la formación de calosa (Figura 3).

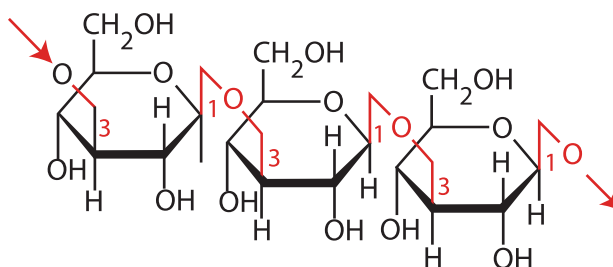
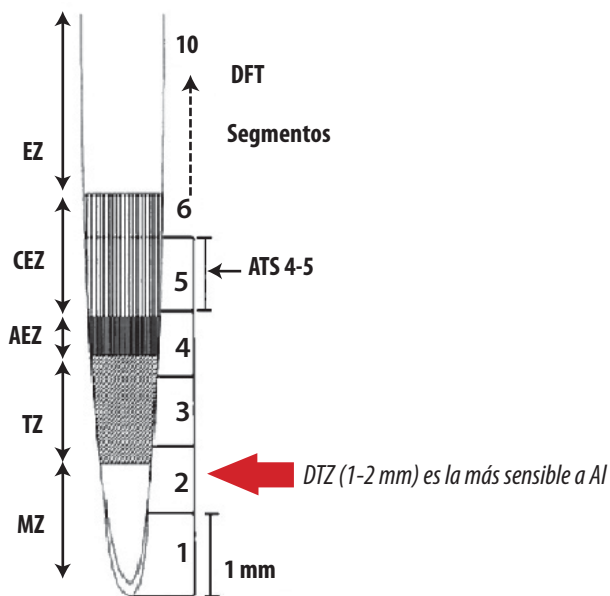


Figura 2. Estructura de la calosa (polímeros de glucosa).
Tomado de Sengbusch P.V. (2003).



EZ=zona de elongación; CEZ=zona de elongación central; AEZ=zona de elongación apical; TZ=zona de transición; MZ=zona meristemática; DTZ=parte distante de la zona de transición; ATS=segmento tratado con aluminio; DFT=distancia desde el ápice radicular.

Figura 3. Lugar de la raíz donde se produce daño por aluminio.
Tomado de Sivaguru y Horst (1998).

4.1 Funciones

Los diferentes procesos en la formación de calosa constituyen un modelo para estudiar los mecanismos bioquímicos involucrados en la percepción y transmisión de señales por parte de la célula, lo cual se traduce en una rápida reacción de defensa de la planta (Kauss et al. 1989). Se cree que la función de la calosa es participar en la reparación del sistema de transporte entre células a través del simplasto (Wissemeyer et al. 1987). Desempeña asimismo un papel importante en la absorción de agua (Bhalla y Slattery, 1984). Además, la acumulación de calosa parece estar involucrada en la repuesta de las plantas a daños mecánicos y químicos causados por diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos (Fincher y Stone, 1981; Hachler y Holh, 1984). Se ha reportado la formación de calosa en plantas a causa de toxicidad por diferentes elementos, como boro (Van de Venter y Currier, 1977); cobalto, níquel y zinc (Peterson y Rauser, 1979); manganeso y aluminio (Wissemeyer y Horst, 1992; Guichang et al. 1994).

4.2 Metabolismo de la calosa

En estudios in vitro se ha encontrado que la calosa es producto de la activación de la enzima *1,3-β-glucano sintasa* y que depende fuertemente de la concentración del ion divalente Ca^{2+} en el citoplasma (Kauss, 1985). Este tipo de activación enzimática es reversible y se puede activar en diferentes lugares de la célula. Una hipótesis es que la enzima se mantiene latente en células sin alterar cuando la concentración de Ca^{2+} citoplasmático permanece en un rango de $0.1 \mu\text{M}$; se activa cuando las células sufren daños o son permeables a Ca^{2+} , de manera que la concentración en el citoplasma se incrementa. En consecuencia, se pueden formar depósitos de calosa desde la superficie de la membrana plasmática hasta la pared celular (Figura 4).

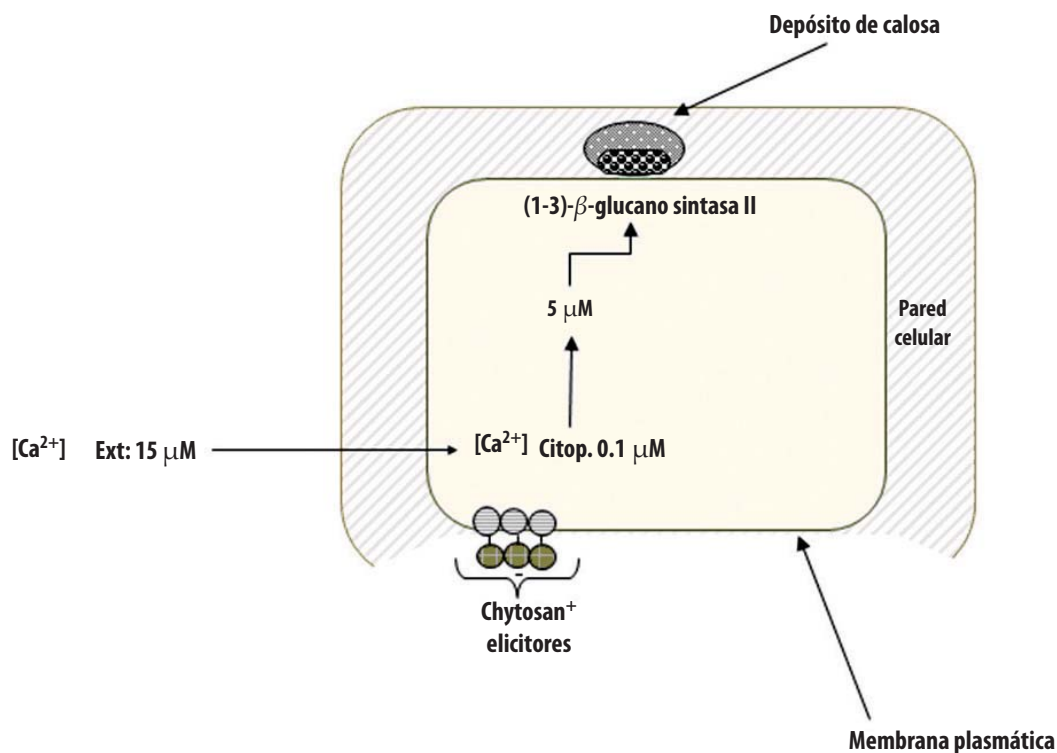


Figura 4. Representación de la posible ruta de formación de calosa en la célula.

Basado en Kauss (1985)

5. Determinación de calosa en ápices radiculares

Este procedimiento se divide en dos fases, una de invernadero y otra de laboratorio. La primera consta de tres pasos: 1) preparar la semilla de los genotipos que se utilizarán en la determinación de calosa; 2) cultivar los genotipos en una solución nutritiva a la que se agrega aluminio; y 3) obtener la porción de cada ápice radicular que se llevará al laboratorio.

La segunda fase, de laboratorio, comprende la preparación de reactivos y todos los procedimientos que sean necesarios hasta realizar en el espectrofotómetro la lectura de Pachyman (PE), que es también un polisacárido (*1,3-β-D glucano*) derivado de los esclerosios de *Poria cocos* (un basidiomiceto) y sirve como punto de comparación en la curva de estandarización del método, por su similitud con la calosa. Se le utiliza porque la enzima *1,3-β-glucano* sintasa aún no ha sido purificada (Kauss et al. 1989).

5.1 Fase de invernadero

5.1.1 Preparación de semilla

Antes de la etapa de germinación, se recomienda tratar la semilla con hipoclorito de sodio al 0.5% por 5 minutos y luego lavar con abundante agua, para no dañar el embrión.

Para la germinación deberá utilizarse papel de germinación en lugar de arena o suelo. El papel evita que los ápices radiculares se dañen. Este es un aspecto muy importante que debe tenerse en cuenta, porque el ápice radicular es la parte de la raíz que permite determinar el contenido de calosa. El papel de germinación tiene dos hojas, una gruesa y otra delgada. Ambas se humedecen en agua normal por 15 minutos; en seguida se colocan de 20 a 30 semillas a un centímetro del borde de la hoja gruesa, de manera que cuando la radícula de la plántula emerja apunte hacia la parte inferior (Figura 5). El paso siguiente es cubrir las semillas con la hoja más delgada y formar rollos, cuya parte inferior se sujeta con

bandas elásticas (Figura 6). Se rotula cada uno de los rollos y se colocan en bandejas con solución 1mM de CaSO_4 ¹, que ayuda a que la semilla emerja (Figura 7). Los rollos deberán permanecer cuatro días en una cámara de germinación a 30 °C y 70% de humedad relativa, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad².



Figura 5. Posición de las semillas en papel para su germinación.



Figura 6. Aseguramiento de las semillas con bandas de caucho.

¹ La solución de CaSO_4 1mM se prepara a partir de una solución 10 mM, tomando un litro de la misma y aumentando hasta 10 litros.

² Previamente se le añaden 3 cm de lámina de solución de CaSO_4 1mM y ahí permanecerán hasta la germinación.

5.1.2 Preparación de la solución nutritiva

Saque las plántulas de la cámara de germinación y colóquelas en bandejas con solución nutritiva. Es necesario que las plántulas pasen por un proceso de adaptación de 24 a 36 horas antes de aplicarles aluminio.

La solución nutritiva se forma a base de soluciones madre o stock, que a la vez contienen diferentes compuestos químicos (Anexo 1). Para facilitar la preparación de las soluciones, prepare una solución 10 veces más concentrada que la que se utiliza para las plantas, y a partir de ésta separe las dosis adecuadas para cada una. La solución nutritiva se vierte en bandejas de 20 litros de capacidad dispuestas en el invernadero, conforme al siguiente procedimiento:

1. Vacíe en cada bandeja 15 litros de agua doblemente desionizada.
2. Añada 2 litros de la solución A, 400 ml de la solución B y 20 ml de la solución C.
3. Complete el volumen hasta 20 litros con agua doblemente desionizada.

Guarde el sobrante de las soluciones A, B y C en oscuridad y a temperatura ambiente.



Figura 7. Posición de los rollos de papel con semilla, previamente rotulados, que se guardarán en cámaras de germinación.

5.1.3 Trasplante

Es recomendable transferir las plántulas al invernadero en horas de la mañana. Seleccione tres plántulas por cada genotipo, cuidando que su sistema radicular no esté dañado, y enróllelas en espiral en cintas de espuma de 25 cm de largo x 3 cm de ancho x 1 cm de espesor (Figura 8). A continuación, coloque las plántulas en los orificios de la gradilla de las bandejas, previamente rotuladas, según el diseño experimental que utilice. Asegúrese de que tengan aireación continua mediante un dispositivo instalado para tal fin (Figura 9). Las plántulas permanecerán de 24 a 36 horas en las bandejas en proceso de adaptación.



Figura 8. Enrollamiento de las plántulas de maíz en espuma para luego ser sumergidas en una solución nutritiva.



Figura 9. Aireación continua de la solución nutritiva en las bandejas con plántulas de maíz.

5.1.4 Tratamiento con aluminio

Se realiza después del periodo de adaptación. Antes de aplicar el aluminio, el pH de la solución nutritiva deberá ajustarse a 4.3, conforme al siguiente procedimiento:

- Si el pH es mayor a 4.3, redúzcalo gradualmente agregando de 1.5 a 2 ml de HCl 0,1 M. Si es menor a 4.3, haga la corrección agregando KOH 1M.
- Ya corregido el pH, agregue aluminio en forma de AlCl_3 .
- A tal efecto, prepare una solución stock de AlCl_3 50 mM: pese 1.207g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y disuelva en 100 ml de agua doblemente desionizada. Esta solución deberá prepararse cada vez que se haga un tratamiento con aluminio.
- Vacíe 10 ml de la solución anterior en cada bandeja con 20 litros de solución nutritiva con pH ajustado a 4.3, para obtener una concentración final de 25 μM de aluminio.

Las plántulas deberán permanecer 12 horas con tratamiento de aluminio. A continuación corte el ápice radicular de cada genotipo (Figura 10), con objeto de determinar la cantidad de calosa.



Figura 10. Corte y almacenamiento de un centímetro de ápice radicular después de haber sido expuesto a un tratamiento de aluminio por 12 horas.



5.2 Determinación de calosa

En esta sección se describen los pasos para la preparación de reactivos y de muestras, y para el procesamiento de datos.

5.2.1 Preparación de reactivos

Ver Anexos 2 y 3.

5.2.2 Preparación de muestras (ápices radiculares)

- Corte 1 cm del ápice radicular de cada plántula y coloque las muestras en viales o frascos pequeños de 2.0 ml con etanol al 96% o nitrógeno líquido (Figura 10); refrigérelas a 4 °C. El etanol se utiliza como conservador y para evitar actividad enzimática que destruye la membrana celular —formada principalmente de fosfolípidos—, desnaturaliza la proteína y disminuye la actividad enzimática en los ápices de la raíz. El etanol precipita las proteínas solubles, porque actúa sobre la calosa sintetasa y, al mismo tiempo, inactiva los microorganismos que pudieran modificar las características de la raíz. El nitrógeno líquido inactiva las enzimas por efecto de la baja temperatura. De esta manera las muestras de raíz se pueden conservar por largo tiempo.
- Para la extracción de calosa, elimine el alcohol de las muestras; deje escurrir el vial que contiene las raíces; a continuación agregue 500 μl NaOH 1M y tres balines de metal para homogeneizar las raíces cuando las coloque en el mezclador de alta velocidad (Mixer Mill) a 20 ciclos s^{-1} por tres minutos. Después de homogeneizar las raíces, agregue 500 μl de NaOH 1M y, con la ayuda de magnetos, remueva los balines.
- Cierre los viales e incube en baño maría a 80 °C por 20 minutos para solubilizar la calosa. A temperaturas superiores a 80 °C la estructura de la calosa se destruye y se convierte en azúcar, por ser un polisacárido (Glucosa 1-3 B-glucano) de 600 a 900 cadenas de longitud.
- Deje enfriar a temperatura ambiente.

- Centrifugue a 12,000 rpm por 10 minutos para que la calosa quede en el sobrenadante y se precipiten los residuos.
- De las muestras centrifugadas prepare dos submuestras de 200 µl en tubos de ensayo. Si no necesita la muestra blanco, únicamente prepare una submuestra.
- A esta submuestra añada 1.25 ml de una mezcla de anilina o solución 1 (ver Anexo 2). Póngala en el agitador y mezcle por 1-2 segundos. Si es necesario preparar la muestra blanco, a la segunda submuestra agregue 1.25 ml de mezcla de la solución 2.
- Incube los tubos de ensayo a 50 °C en baño maría por 20 minutos para que se produzca la decoloración del azul de anilina y la formación del complejo de siroflúor-calosa.
- Las muestras se dejan enfriar por 15 minutos a temperatura ambiente. Si quiere acelerar el enfriamiento, aplique agua a temperatura ambiente.
- Las mediciones de calosa se pueden hacer en un microplato o un espectrofotómetro de fluorescencia. En el microplato (Microplate reader), se utiliza una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 400/30 nm, de emisión (λ_{em}) de 485/40 nm y sensibilidad de 50; en el espectrofotómetro (*Fluorescence spectrophotometer Model F-2500 Hitachi®*), una longitud de excitación (λ_{ex}) de 394/5 nm, de emisión (λ_{em}) de 485/5 nm, pase de bandas de 5 nm y 700 voltios.

5.2.3 Medición en el espectrofotómetro

Encienda el espectrofotómetro una hora antes de hacer las mediciones para que la lámpara se caliente. Asegúrese de que la cubeta esté limpia. Lávela con cierta periodicidad con HCl 1N por 20 minutos; enjuáguela con abundante agua doblemente desionizada. Nunca use detergente. El procedimiento para la lectura de Pachyman en el espectrofotómetro se explica en el Anexo 4: *Manejo del programa del espectrofotómetro*. Antes de hacer la medición de las muestras, genere una curva de calibración considerando un rango de valores: 0 – 10 µgPE/ml con intervalos de 1.25 y un valor de R^2 cercano a 1 (i.e. 0.998) (Tabla 3).

5.3 Procesamiento de datos

- Mida con el espectrofotómetro la intensidad de fluorescencia (Y) de cada una de las muestras de raíz provenientes del invernadero que corresponda a la concentración de Pachyman (X) (Tabla 3 y Figura 11).
- Para cuantificar la cantidad de calosa (Y), tenga en cuenta los valores de fluorescencia (X) y calcule la ecuación de la recta de regresión y su coeficiente de determinación R^2 (Figura 12). No es una condición que la línea de regresión pase por el origen. En este caso, se espera que R^2 tenga un valor muy cercano a 1, $R^2 = 0.998$. Por tanto, la cantidad de Pachyman muestra indirectamente la cantidad de calosa.

Tabla 3. Concentración de Pachyman e intensidad de fluorescencia para la curva de calibración.

No. de muestra	Concentración de Pachyman (µg PE/ml)	Intensidad de fluorescencia
1	0.00	104
2	1.25	178.2
3	2.50	251.7
4	3.75	333.8
5	5.00	430.5
6	6.25	507.7
7	7.50	572.4

$$R^2 = 0.998$$

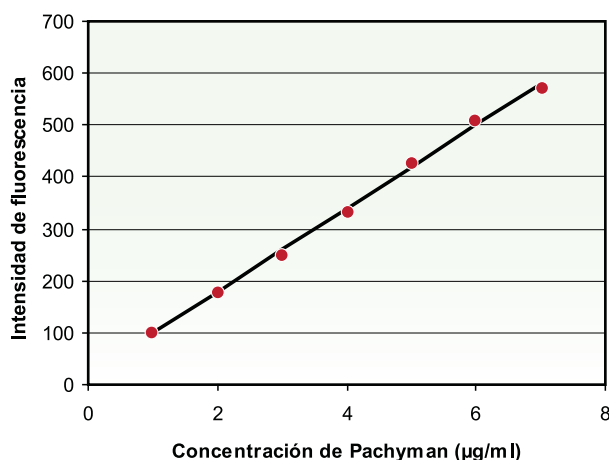


Figura 11. Concentración de Pachyman e intensidad de fluorescencia en ápices radicales de maíz.

- Es mejor calcular la cantidad de calosa por centímetro de ápice radicular, considerando que se midió la intensidad de fluorescencia de tres ápices radiculares. Estos datos son de utilidad para graficar el contenido de calosa de cada genotipo con tratamiento de aluminio (25 µm de Al) o sin tratamiento (0 µm de Al) (Tabla 4 y Figura 13). Aunque la diferencia en el contenido de calosa es una característica genética, como se muestra en la Figura 13 (con 0 Al), las diferencias se mantienen proporcionalmente al aplicar aluminio (Al 25). Por consiguiente, en la práctica se recomienda medir únicamente la cantidad de calosa después de aplicar 25 µm de aluminio.

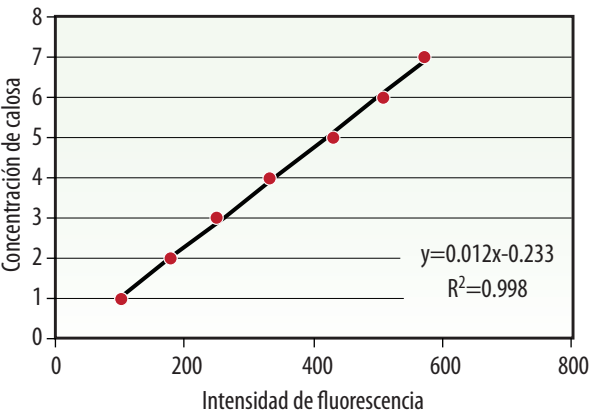


Figura 12. Intensidad de fluorescencia y contenido de calosa (µgPE/1 cm ápice radicular) en líneas de maíz.

Tabla 4. Contenido de calosa en líneas de maíz con aluminio (25 µM Al) y sin aluminio (0 µM Al).

Genotipo	Medias de contenido de calosa (µg PE/ 1-cm de puntas de raíces)		Desviación estándar (Sd)	
	25 µM Al	0 µM Al	25 µM Al	0 µM Al
SA1660-8	4	0.16	0.69	0.03
SA1694-32	3.22	0.27	0.54	0.22
SA1694-43	2.64	0.17	0.49	0.01
SA1694-41	2.6	0.16	0.19	0.03
SA1555-10	2.19	0.14	0.51	0.03
SA1638-6	2.04	0.15	0.48	0.01
SA1501-4	1.11	0.14	0.22	0.02
SA1631-2	1.08	0.14	0.15	0.01

- Hay una gran variación en el contenido de calosa de los genotipos de maíz (Figura 14). Aquellos con mayor contenido de calosa son sensibles al aluminio, y viceversa. En la Figura 14 se aprecia el contenido de calosa de dos líneas de maíz que se utilizaron como testigos en la Universidad de Hannover, Alemania. El testigo tolerante es ATP (con 0.65 ugPE/cm de raíz) y el testigo sensible Lixis (con 5.25 ugPE/cm de raíz). Asimismo, se muestra el contenido de calosa de diferentes líneas de maíz del programa del CIMMYT; aquí se observa un gran contraste entre las líneas, cuyo contenido va desde 0.25 hasta 6.2 ugPE/cm de raíz. En ensayos de determinación de calosa es conveniente incluir en cada uno un testigo tolerante y uno susceptible; también se recomienda presentar los datos como contenido relativo de calosa, donde el genotipo susceptible representa el 100%.

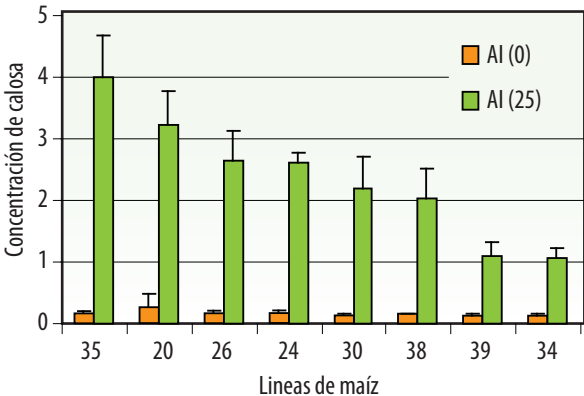


Figura 13. Contenido de calosa (µgPE/1 cm ápice radicular) en líneas de maíz con y sin tratamiento de aluminio.

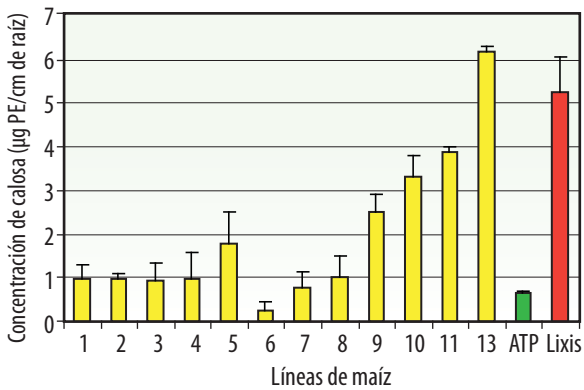


Figura 14. Diferencias notables en la formación de calosa en líneas endogámicas de maíz y testigos (ATP y Lixis).

6. Bibliografía

- Bahia Filho, A.F.C., R. Magnavaca, R.E. Schaffert y V.M.C. Alves. 1997. Identification, utilization and economic impact of maize germplasm tolerant to low levels of phosphorus and toxic levels of exchangeable aluminum in Brazilian soils. p.57-70 *En*: A.C. Moniz, A.M.C. Furlani, R.E. Schaffert, N.K. Fageria, C.A. Rosolem y H. Cantarella (eds.), Plant-soil interactions at low pH. Brazilian Soil Science Society, Campinas/Vicosa, Brasil.
- Bhalla, P.L. y H.D. Slaterry. 1984. Callose Deposits make Clover Seeds Impermeable to Water. *Ann. Bot.* 53, 125-128 Citado por Wissemeier et al. 1987.
- Bolan, N.S., M.J. Hedley y R.E. White. 1991. Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume-based pastures. *Plant Soil* 134:53-63.
- Cancado, G.M.A., L.L. Loguerio, P.R. Martins, S.N. Parentoni, E. Paiva, A. Borem y M.A. López. 1999. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Gen.* 99:747-754.
- Cochrane, T.T. 1979. An ongoing appraisal of the savanna ecosystems of Tropical America for beef cattle production. *En* Sánchez, P.A. y Tergas, L.E. (Eds.) Producción de pastos en los suelos ácidos de los trópicos. CIAT, Cali, Colombia 1-14 pp.
- Collect, L., C. De León, M. Kollmeier, N. Schmohl y W. Horst. 2002. Assessment of aluminum sensitive of maize cultivars using roots of intact plants and excised root tips. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 357-365.
- Eswaran, H., P. Reich y F. Beinroth. 1997. Global distribution of soils with acidity. P.159-164. *En*: A.C. Moiz, A.M.C. Furlani, R.E. Schaffert, N.K. Fageria, C.A. Rosolem, and H. Cantarella (eds.), Plant-soil interactions at low pH. Brazilian Soil Science Society. Campinas/Vicosa, Brasil.
- Eticha, E., C. Welcker, L. Narro, A. Stab y W. Horst. 2005. Aluminium-induced callose formation in root apices: inheritance and selection trait for adaptation of tropical Maize to acid soils, *Field Crop Res.* 93: 252-263.
- Fincher, G.B.; A.B. Stone: *En* Tanner, W. y F. A. Loewus (eds.): *Encyclopaedia of Plant Physiology*, New Series Vol. 13 B, 110-132, Springer-Verlag, Berlín (1981).
- Foy, C.D. 1988. Plant adaptation to acid aluminum-toxic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 24:2179-2191.
- Furlani P.R. y R.B. Clark. 1981. Screening Sorghum for aluminum tolerance in Nutrient solutions. *En* *Agron J.* 73:587-594.
- Giaveno, C.D. y J.B. Miranda Filho. 2000. Rapid screening for aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Genet. Mol. Biol.* 23:847-850.
- Gollin, D. 2006. Impacts of International Research on Intertemporal Yield Stability in Wheat and Maize: An Economic Assessment. México, D.F.: CIMMYT.
- Guichang Z., J. Hoddinott y G. Taylor. 1994. Characterization of 1,3-β-D-Glucan (Callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to Aluminium Toxicity. *J. Plant Physiol.* Vol. 144. pp. 229-234
- Hachler, H. y H.R. Holth. 1984. Temporal and spatial distribution patterns of collar and papillae wall appositions in resistant and susceptible tuber tissue of *Solanum tuberosum* infected by *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol* 24: 107-118.
- Horst, W.J., A.K. Puschel y N. Schmohl. 1997. Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant and Soil* 192:23-30.
- Kauss, H. 1985. Callose biosynthesis as a Ca²⁺ regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. *Cell Sci. Suppl.* 2, 89-103.
- Kauss, H. 1996. Callose synthesis. *En* M.Smallwood, J.P. Knox and D.J. Bowles (eds) *Membranes: Specialized Functions in Plants*, Bios Scientific Publishers, Guildford, Reino Unido, pp. 77-92.
- Kauss H., T. Waldman, W. Jeblick, G. Euler, R. Ranjeva y A. Domard. 1989. Ca²⁺ is an important but not the only signal in callose synthesis induced by chitosan, saponins and polyene antibiotics. *In* *Molecular signals in Microbe-plant Symbiotic and Pathogen Systems*. Ed. B.J.J. Lugtenberg Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York.
- Magnavaca, R., C.O. Gardner y R.B. Clark. 1987. Evaluation of inbred lines for aluminum tolerance in nutrient solution. *In* H.W. Gabelman & B.C. Longman, eds. *Genetic aspects of plant-mineral nutrition*, p. 255-265. Dordrecht, Países Bajos, Martinus Nijhoff Publ.
- Pettersson, C.A. y W. Rauser. 1979. Callose deposition and photoassimilate export in *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel, and zinc. *Plant Physiol.* 1979. 63: 1170-1174.
- Pingali, P.L.(ed). 2001. CIMMYT 1999-2000. World Maize Facts and Trends. Meeting World Maize Needs: Technological Opportunities and Priorities for the Public Sector. México, D.F.:CIMMYT.
- Samac, A.S. y M. Tesfaye. 2003. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 75:189-207.
- Sengbusch, P.V. 2003. Botanic online. Glucanes Containing *beta-glycosidic* Linkages. <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e17/17c.htm>.
- Sivaguru, M., Horst, W.J. 1998. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116:155–163.
- Stone, B.A. y A.E., Clark. 1992. Chemistry and physiology of higher plants 1,3 β-glucano (callose). *En*: B.A. Stone and A.E. Clark (eds) *Chemistry and Biology of (1,3)-β-glucano*, La trobe University Press, Bundoora, Australia, pp 365-429.
- Urrea-Gómez, R., H. Ceballos y A. León. 1996. A greenhouse screening technique for acid soil tolerance in maize. *Agron. J.*, 88: 806-811.
- Van De Venter H. A. y H.B. Currier. 1977. The effect of Boron deficiency on callose formation and 14C translocation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Am J. Bot.* 64, 861-865.
- Von Uexkull H. y E. Mutert. 1995. Global extent, development and economic impact of acids soils. *Plant Soil* 171: 1-15.
- Wissemeier, A.H., F. Klotz y W.J. Horst. 1987. Aluminium induced callose synthesis in roots of soybean (*Glycine max* L.). *J. Plant Physiol.* 129:487-492.
- Wissemeier, A.H. y W.J. Horst. 1992. Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant Soil* 143, 299-309.

Anexo 1. Preparación de la solución nutritiva (invernadero).

Solución A. Para obtener 50 litros de esta solución:

1. Prepare un litro de cada uno de los nueve componentes que se indican en la Tabla A1: KNO_3 , NH_4NO_3 , MgSO_4 , KH_2PO_4 , H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Añada la cantidad de sales que se indican. Si el MgSO_4 no se disuelve fácilmente, caliéntelo para ayudar a la solubilización.
2. A 25 litros de agua doblemente desionizada agregue la cantidad de los nueve componentes que se indican en la Tabla A1. Después complete el volumen hasta 50 litros con agua doblemente desionizada.

Para la Solución B:

1. Pese 17.2 g de sulfato de calcio (CaSO_4) y disuélvalo en 10 litros de agua doblemente desionizada.
2. Deje la mezcla en agitación por lo menos cuatro horas. En este paso la concentración de la solución será de 10 mM de CaSO_4 ; en la dilución para las plantas será de 250 μM

Para la Solución C, aplique el siguiente procedimiento:

1. En 400 ml de agua doblemente desionizada disuelva 5.41 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; en otros 400 ml de agua doblemente desionizada disuelva 7.45 g de Na-EDTA.
2. Cuando se hayan disuelto los componentes, mezcle las dos soluciones y complete hasta 1 litro con agua doblemente desionizada.

Con esto, la solución C alcanzará una concentración final de 20 mM de Fe-EDTA y para las plantas será de 20 μM .

Tabla A1. Componentes de la solución nutritiva.

Compuesto	Concentración para las plantas (μM)	Peso para 1 litro de solución stock (g)	Solución stock ml/50L
KNO_3	400	50.56	400
NH_4NO_3	200	40.02	200
MgSO_4	100	123.24	100
KH_2PO_4	10	68.05	10
H_3BO_3	8	4.95	50
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.5	50
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.58	50
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1	1.69	50
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	1.24	50
Solución B			
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	250	1.72	
Solución C			
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20	5.41	
Na-EDTA		7.45	

Anexo 2. Preparación de reactivos (laboratorio).

Para la determinación de calosa necesitará lo siguiente:

1. Tampón de glicina (1M glicina buffer).
2. Ácido clorhídrico 1M.
3. Solución de anilina 0.1 % o azul de metileno (Methyl blue).
4. Solución 1 (mezcla de anilina).
5. Solución 2 (mezcla sin anilina).
6. Solución de NaOH 1M.

1. Preparación del tampón de glicina 1 M de pH 9.50 ($C_2H_5NO_2$, peso molecular: 75.07 g/mol)

Disuelva 75.07 g de glicina en 1 litro de agua doblemente desionizada. El pH de esta solución deberá elevarse hasta 9.5 añadiendo cristales de NaOH mientras está en agitación con un magneto. Añada los cristales de NaOH en pequeñas cantidades y espere hasta que se disuelvan; controle al mismo tiempo el pH. El pH nunca deberá aumentarse a más de 9.5³. Esta actividad puede durar de 1 a 2 horas, aproximadamente.

2. Preparación de HCl 1 M (HCl 37% = 12 M; densidad=1.19 kg/l PM=36.5g/mol de Merck)

Tome 83 ml de HCl al 37 %, 12 M y vacíelo en un 1 litro de agua doblemente desionizada. Esta solución tendrá una concentración 1M.

3. Preparación de la solución de azul de metileno 0.1% en agua ($C_{37}H_{27}N_3Na_2O_9S_3$, peso molecular: 799.82 g/mol, de Sigma)

Pese 1 g de azul de metileno y disuélvalo en 1 litro de agua doblemente desionizada. Esta solución tendrá una concentración 0.1 %.

4. Mezcla de anilina (Solución A)

Se prepara con glicina, HCl y anilina en las siguientes proporciones:

21 ml 1 M HCl + 59 ml de tampón de glicina 1 M de pH 9.5 + 40 ml de azul de metileno Blue 0.1%.

El pH de esta solución deberá ser de entre 3.7 y 4. Si la escala del pH es menor o mayor, indica que hay un deterioro en la solución y que deberá descartarse.

El orden de las soluciones que van a mezclarse para preparar la solución A es importante, ya que con estas cantidades se pueden preparar hasta 75 muestras de 110 ml. Se recomienda preparar unas cinco veces estas cantidades (550 ml).

La solución se puede conservar por largo tiempo en refrigeración a 20 °C, en oscuridad. Verifique el pH de la solución cada vez que vaya a utilizarla; debe ser de 3.7 aproximadamente.

5. Mezcla sin anilina (Solución B o blanco)

Se prepara mezclando tampón de glicina, HCl y agua doblemente desionizada en las siguientes proporciones: 21 ml 1 M HCl + 59 ml tampón glicina 1 M de pH 9.5 + 40 ml de agua doblemente desionizada.

³ La solución de glicina comienza con un pH de 6.2; la cantidad de cristales de NaOH requeridos es de alrededor de 14.5 g)

Con la solución blanco se determina la autofluorescencia. Dado que la planta contiene muchos compuestos que generan autofluorescencia —fenoles, clorofila, taninos, lignina—, podría generarse una fuente de error al hacer mediciones de calosa. Para evitarlo, se agrega anilina, que produce fluorescencia por efecto de la formación del complejo siroflúor-calosa. Al agregar anilina a los ápices radiculares es posible medir la fluorescencia total producida por la calosa y otros compuestos orgánicos de la planta. En cambio, la muestra del blanco mide la fluorescencia que producen otros compuestos, excepto la calosa. Si el valor de esta última es muy pequeño, no será necesaria la solución blanco.

Existe una relación lineal entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración de Pachyman y, por consiguiente, con el contenido de calosa. Al generar la curva de calibración utilice valores que incluyan las concentraciones de Pachyman que se encuentran en las plantas, valores cercanos a 2 µg/ml.

6. Preparación de la solución NaOH 1 M

Esta solución se prepara con 40 g NaOH disueltos en 1 litro de agua doblemente desionizada. La solución resultante deberá conservarse en refrigeración a 4 °C.

Anexo 3. Preparación de estándares.

1. Prepare una solución de Pachyman disolviendo 10 mg Pachyman en 50 ml de solución NaOH 1M, para obtener una solución de 200 µg PE/ml. Ésta es una solución 10 veces más concentrada que la que se necesita.
2. Colóquela en baño maría a 80 °C por 20 minutos.
3. Tome 5 ml de esta solución concentrada de Pachyman y complétela con 45 ml de solución NaOH 1M, para obtener un volumen final de 50 ml con una concentración de 20 µg PE/ml. Esta solución será la que utilice para construir la curva de calibración.
4. La nueva solución de Pachyman se puede conservar en una nevera a 4 °C hasta por seis meses.

Tras obtener la solución stock, prepare a continuación las diferentes concentraciones del estándar para construir la curva de calibración con un volumen final por muestra de 2,000 µl.

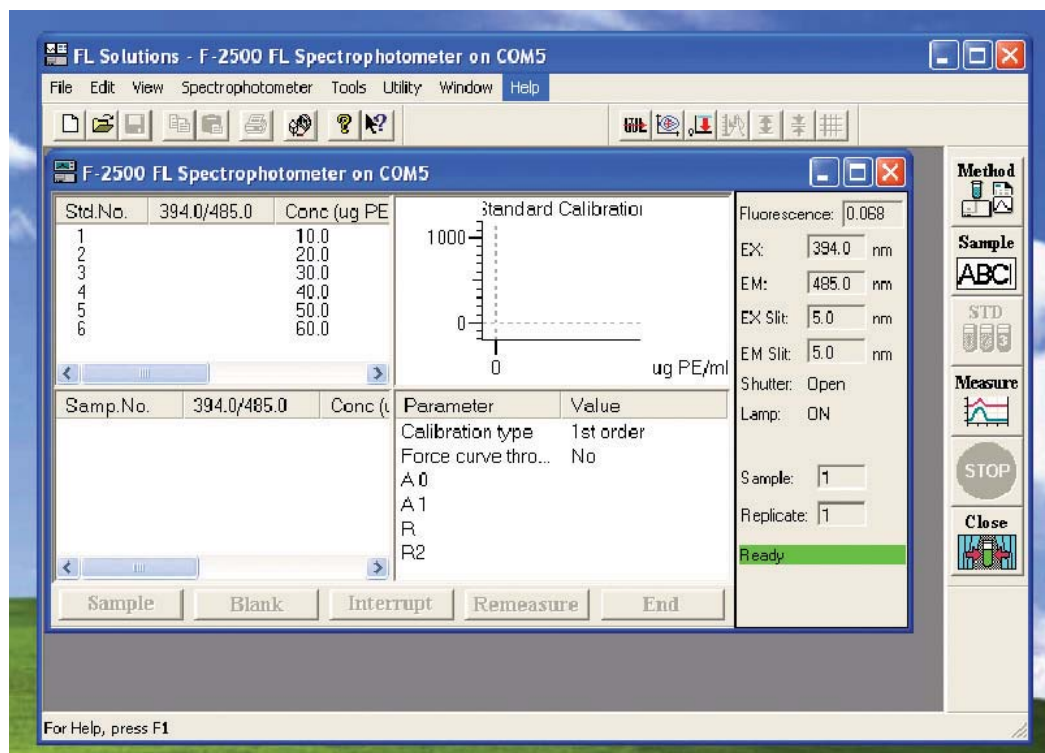
Tabla A2. Concentraciones para la preparación de la solución estándar.

Concentración (µg PE/ml)	Volumen de V PE (µl)	Volumen de NaOH 1M (µl)	Volumen final (µl)
0.0	0	2,000	2,000
1.25	125	1,875	2,000
2.50	250	1,750	2,000
3.75	375	1,625	2,000
5.00	500	1,500	2,000
6.25	625	1,375	2,000
7.50	750	1,250	2,000
8.75	875	1,125	2,000
10.00	1,000	1,000	2,000

Las muestras se pueden almacenar hasta por cinco meses en una nevera a 4 °C. De estos estándares se toman 200 µl de cada concentración, se colocan en tubos de ensayo a los cuales se agrega 1.25 ml de mezcla de anilina (solución A) y se incuban en baño maría a 50 °C por 20 minutos; se dejan enfriar y se hacen mediciones en el espectrofotómetro. Se recomienda hacer al menos tres repeticiones para cada concentración estándar.

Anexo 4. Manejo del programa del espectrofotómetro.

Antes de encender el computador, ponga en operación el espectrofotómetro. Abra el programa FL Solutions; espere a que se active la columna de parámetros que indique que el programa está listo (READY).



Las funciones principales del programa son dos: *Method* y *Measure*.

1. *Method* tiene dos opciones:

New: Para cambiar los parámetros del espectrofotómetro (p. ej. modificar la longitud de onda, la emisión, la excitación, milivoltios, etcétera).

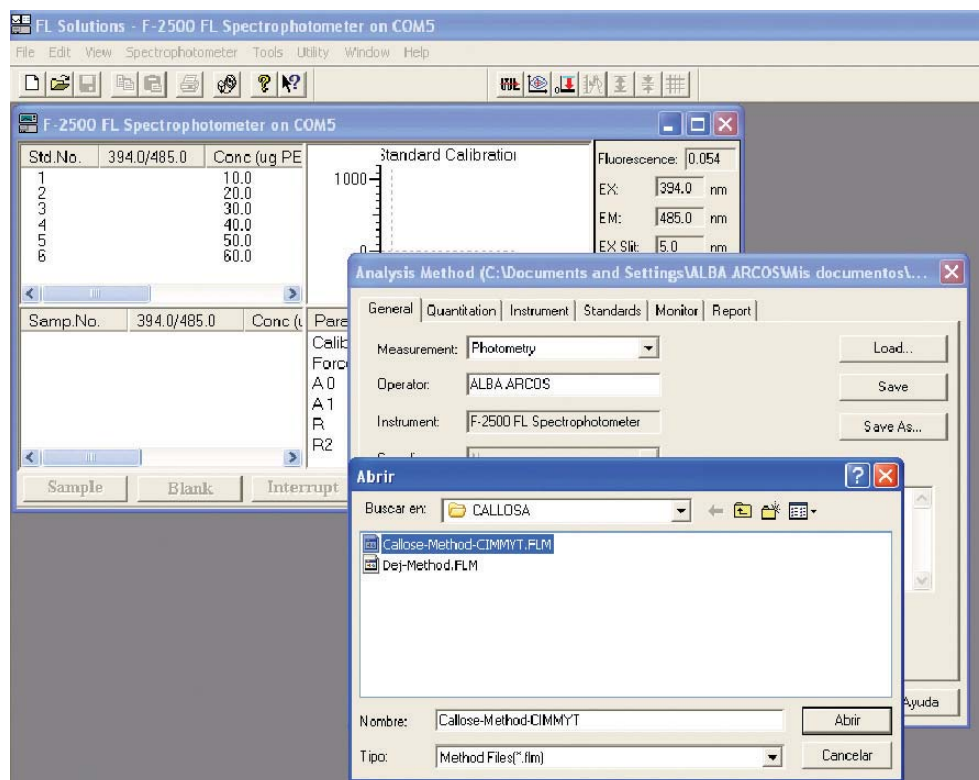
Saved: Para valores ya existentes que se guardan en archivos. Cargue el archivo correspondiente activando la opción Load. Si tiene que buscar la carpeta donde está el archivo (ruta exacta), recurra al menú Open + method + file y verifique la información: General, Quantification, Instrument, Standards, Monitor, Report. Por último, haga clic en aceptar (Accept) y comience a hacer la medición de las muestras, tanto estándar (para calibración) como experimentales.

Al pulsar la tecla **Method** aparece una pantalla con las opciones del programa:
General – Quantification – Instrument – Standards – Monitor – Report.

En la etiqueta **General**, pulse **Abrir archivos**

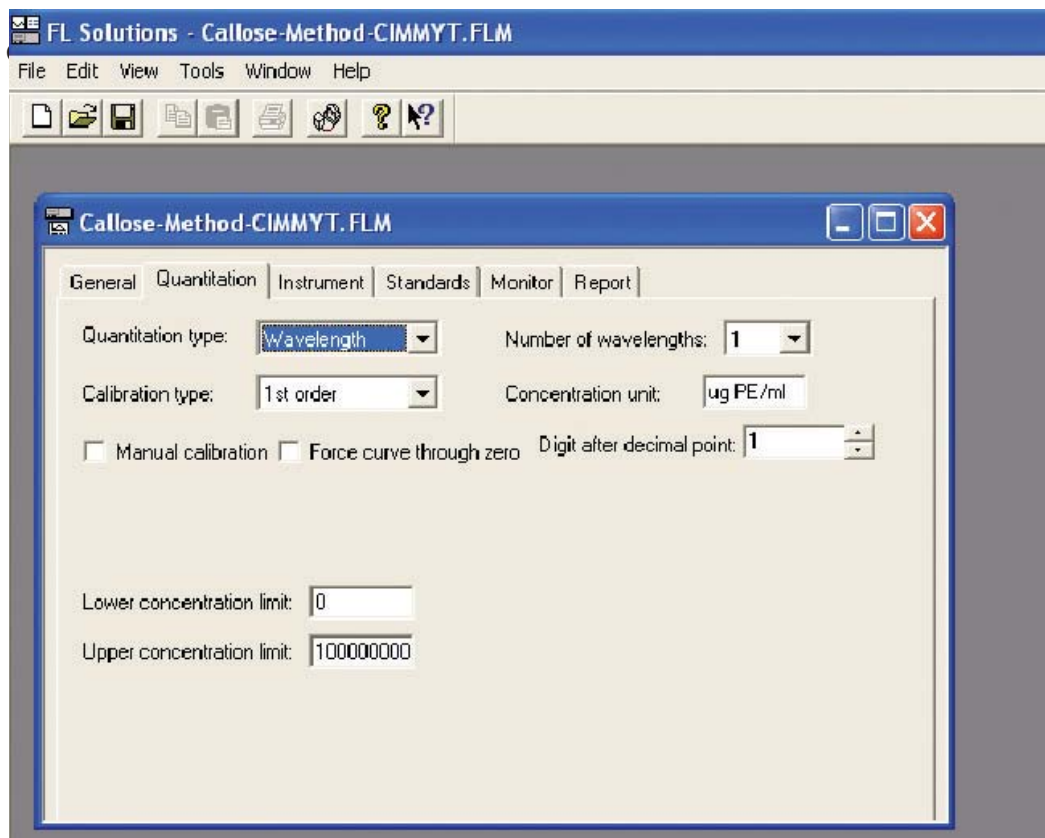
General → Abrir archivo → Load → Data → Escritorio → Calosa → Archivo existente

Cuando localice el archivo existente, renómbrelo, inicie la ejecución del programa y luego pulse **Aceptar**.



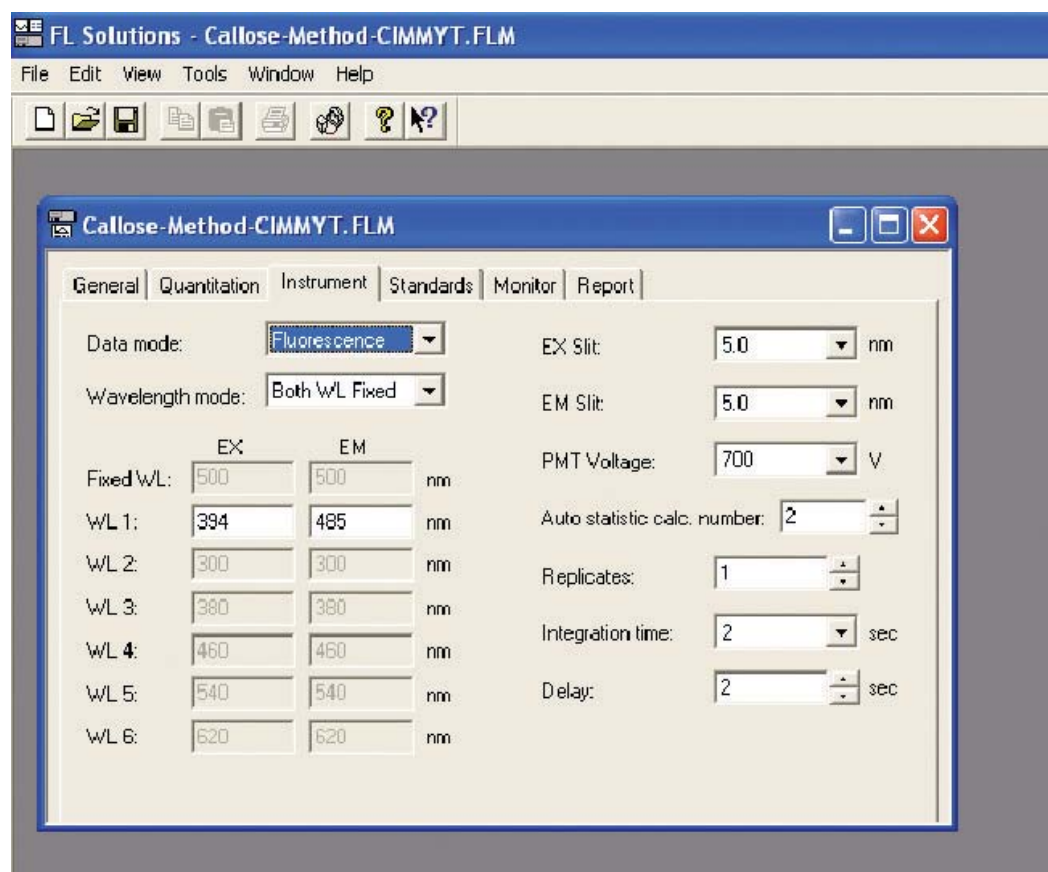
2. Measure

Después de completar los pasos anteriores, pulse la opción **Quantification**, para que comience la verificación de los datos que se alimentaron al programa.



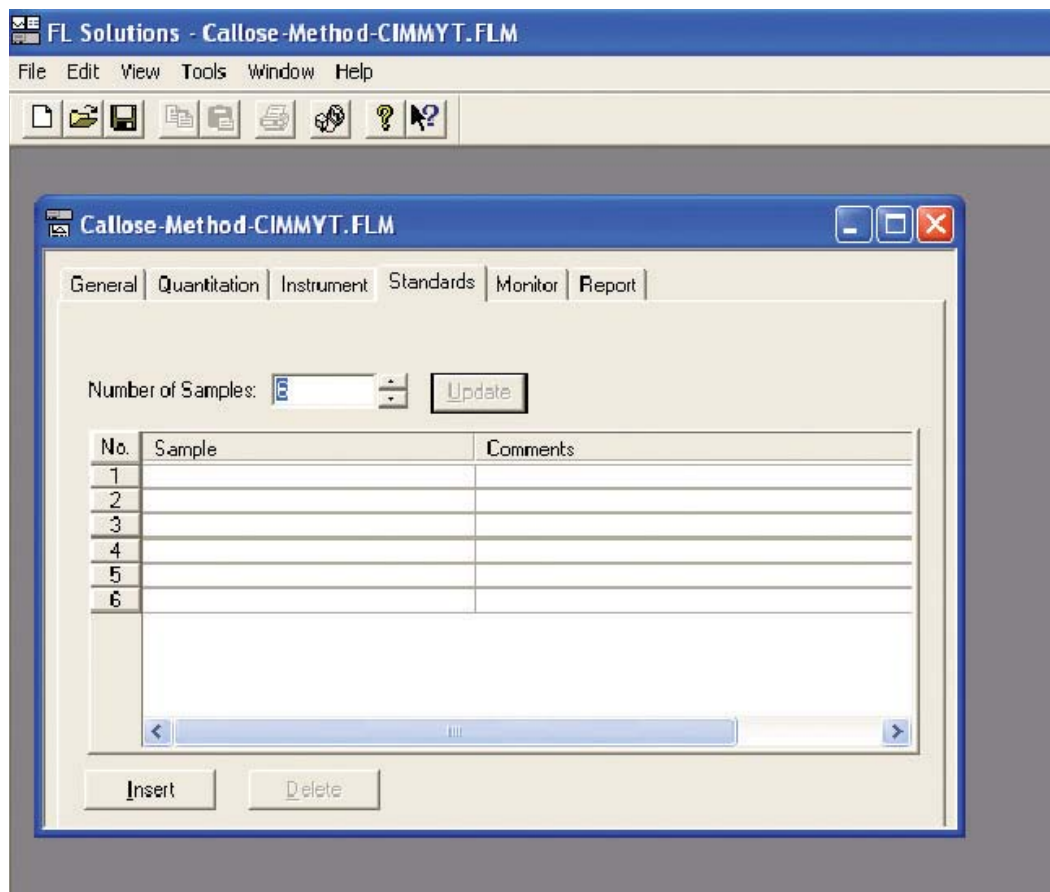
Type calibration: 1st order
Number of wavelength: 1
Concentration unit: $\mu\text{gPE/ml}$
Digit after decimal point: 1
Lower concentration: 0
Upper concentration: 100,000,000

A continuación active **Instrument** para determinar el modo de trabajo, longitud de onda, voltaje y otros datos.



Data mode: Fluorescence
Wavelength mode: Both wl Fixed
EX: 394 nm
EM: 485 nm
Ex slit: 5.0 nm
Em slit: 5.0 nm
PMT Voltaje: 700 v
Auto statistic calc. number: 2
Replicates: 1
Integration times: 2
Delay: 2

En **Standards** defina el número de estándares que va a medir y actualice el dato con la opción **Update**. Como el programa acepta un máximo de nueve muestras estándar, indique el número que de estas muestras vaya a leer el equipo.



Antes de proceder a la lectura de las muestras del ensayo, verifique de 2 a 3 puntos del estándar, únicamente para comparar los datos de la curva estándar. Si no hay diferencias de 5%, no es necesario crear otra curva.

Veáse ejemplo en la pantalla:
Number of samples: 6

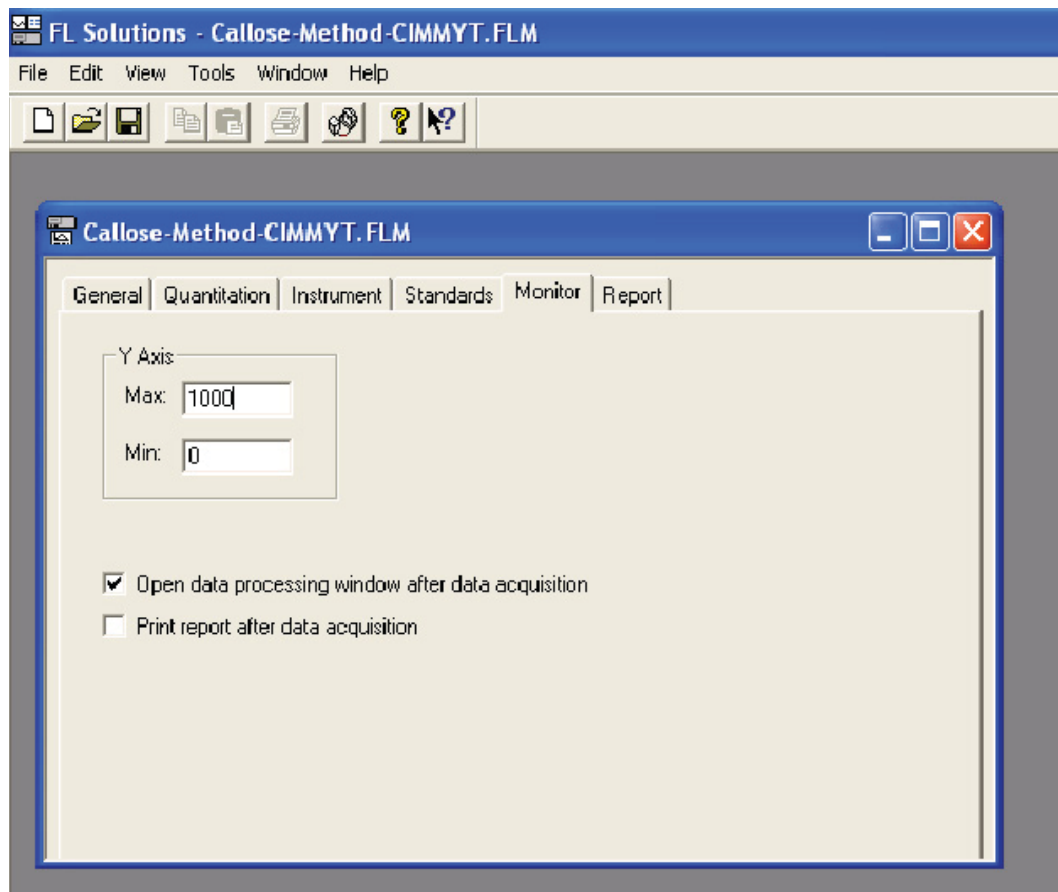
No.	Sample	Comments
1		Con/Sin anilina
2		
3		
4		
5		
6		

Utilice la opción **Monitor** para definir los valores máximo y mínimo del eje Y.

Y Axis

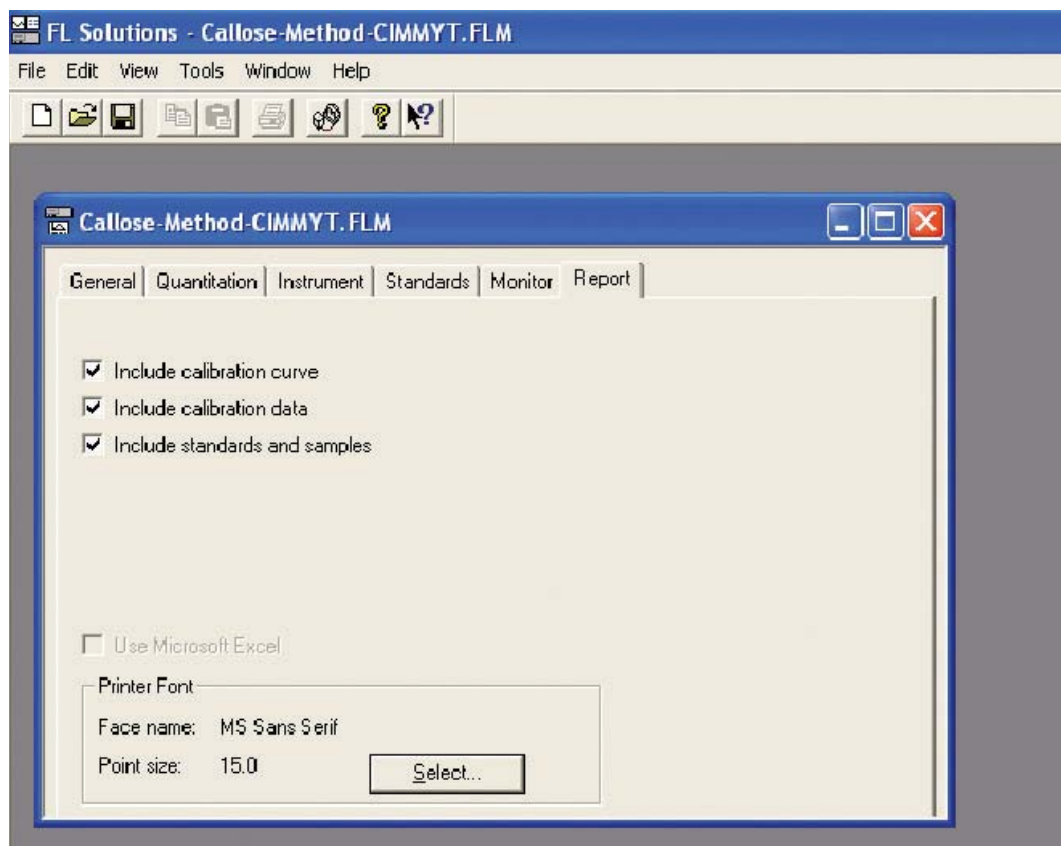
max: 1.000

min: 0



- ☒ Open data processing window after data acquisition
- ☐ Print report after data acquisition

Por último, active **Report** para que en la pantalla aparezcan la curva de calibración y los datos de ésta, tanto de las muestras como de los estándares.



En **Report** marque todas las opciones:

- Include calibration curve
- Include calibration data
- Include standards and samples

Después de que haya definido todos los parámetros de la columna derecha de la pantalla, pulse **Meditation**, para que comience la medición. El programa irá indicando al operador el orden en que tendrá que alimentarse la información de las muestras.

En este paso se mide la intensidad de fluorescencia de cada una de las muestras. Los valores aparecerán en el cuadrante inferior izquierdo del monitor. Los datos que aparecen en el cuadrante superior izquierdo e inferior izquierdo deben importarse a un formato Excel. Por ejemplo: En el cuadrante superior derecho aparecerá un gráfico de la recta de regresión, pero no lo tome en cuenta. Después de copiar y guardar los datos de la lectura en un archivo Excel, presione la tecla END para finalizar la operación del espectrofotómetro.

ISBN: 978-970-648-172-6

**Centro Internacional de
Mejoramiento de Maíz y Trigo**

**E-mail: cimmyt@cgiar.org
Sitio web: www.cimmyt.org**